

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07487

研究課題名（和文）機能改変酵素を用いた革新的真菌感染症診断法の実用化開発

研究課題名（英文）Studies for practical application of diagnostic methods for fungal infections using the functionally modified glycoside hydrolase

研究代表者

山中 大輔 (Yamanaka, Daisuke)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：70734599

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では申請者らが開発した β -1,6-グルカン高感度測定法の真菌感染症診断薬としての応用可能性を検証するため、最適なヒト検体前処理法の検討および医薬品・食品由来の類似多糖による偽陽性反応の発生可能性について各種検討を行った。ヒト血清中には β -1,6-グルカン測定を阻害する因子が認められたが、希釈加熱法を適応することで、血清中の微量 β -1,6-グルカンの検出が可能となった。一部の β -グルカン製剤と僅かな反応を示したものの、血中 β -1,6-グルカン測定において食事の影響を受けにくいことが明らかとなった。以上より、本測定法が真菌感染時に放出される β -1,6-グルカンを検出できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵素をもとに開発した β -1,6-グルカン高感度検出法によって、これまで解析が困難だった β -1,6-グルカンの生体内での挙動を追跡できる可能性があった。本研究では、血清などの生体検体中の β -1,6-グルカンの本測定法で高感度に検出するための最適な前処理法を決定し、感染症診断薬としての応用可能性を示した。また、食事由来 β -1,6-グルカンのマウス体内での挙動についての知見はこれまでもほとんど得られていなかったため、本研究成果は多糖の挙動に関する基礎的な知的基盤としての価値も持つ。

研究成果の概要（英文）：The present study was carried out to determine the optimal pretreatment method for human serum specimen using in the β -1,6-glucan specific ELISA-like test. The results showed that the dilution heating method is a suitable method for reducing the influence of factors that inhibit the assay. Furthermore, we found that blood β -1,6-glucan levels in mice were not increased by a β -1,6-glucan-containing diet. These results indicate that this assay may be able to specifically detect β -1,6-glucan released by fungi during fungal infection.

研究分野：糖質科学

キーワード：深在性真菌症 β -D-グルカン β -1,6-グルカン β -1,6-グルカナーゼ

1. 研究開始当初の背景

真菌の細胞壁はヒトが合成出来ない様々な多糖類 (β -グルカン、マンナン、キチンなど) によって構成される。このうち真菌由来の β -グルカンは、グルコースが β -1,3-結合によって連結した β -1,3-グルカン (13BG) と、 β -1,6-結合により構成される β -1,6-グルカン (16BG) に大別される。深在性真菌症において、真菌感染時に菌体から放出される β -グルカンのうち、13BG はこれまでカプトガニを原料とする検査薬 (リムルス試験) を用いることで患者血中から検出することが可能であり、真菌感染症の血中バイオマーカーとして利用されてきた。しかし、リムルス試験は極めて高感度な検査薬であると同時に、真菌以外に由来する様々な分子に対して偽陽性反応が生じることも知られていた。私たちは真菌から放出される β -グルカンをより正確に検出するために、これまで定量の難しかった 16BG も高感度に測定するためのツール開発を進めてきた。血液中の 13BG のみならず 16BG も測定することで、真菌に対し特異性の高い検査が実施出来る。エンドグルカナーゼをもとに大腸菌を用いて発現させた機能改変型酵素は、糖質加水分解活性を持たず 16BG 結合活性のみを保持していた。これを用いて病原性真菌が放出する可溶性 16BG を特異的に検出する ELISA 様試験を構築した (図 1)。本測定法により、*Candida* 属真菌の多くが細胞壁に 16BG を持ち、増殖時には可溶性 16BG を放出していることが明らかとなり、真菌感染症バイオマーカーとして 16BG が利用できる可能性が示された (Yamanaka D, *et. al.*, *J Biol Chem*, **295**:5362-5376 (2020))。

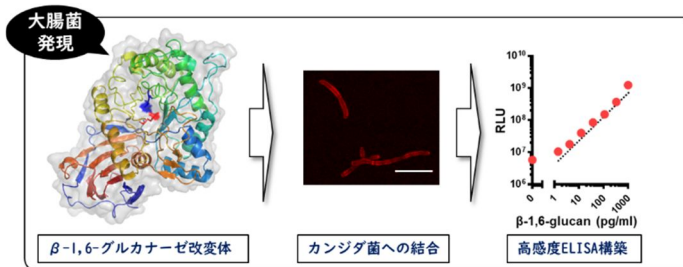


図 1. 糖質分解酵素の機能改変による β -1,6-グルカン結合プロトコルの開発

2. 研究の目的

本研究では真菌感染症バイオマーカーとして 16BG を利用するために、化学発光基質を用いて独自に構築した高感度 16BG 特異的 Sandwich-ELISA を用いて、(1) ヒト血清中に存在する可溶性 16BG を測定するためのヒト検体前処理法の最適化、(2) 真菌以外に由来する様々な β -グルカンとの反応性評価、および (3) β -グルカン過剰摂取マウス検体との反応性評価、の 3 つの項目について検証を進め、本測定法の特徴および生体内の 16BG が示す基礎的な性質について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 各種 β -グルカンとの反応性評価

現在臨床現場に普及している 13BG 測定法は、真菌感染以外の要因に対して偽陽性反応を生じる可能性が知られている。そこで、化学発光基質を用いた 16BG 特異的 Sandwich-ELISA による偽陽性発生リスクについて検証するため、本測定法と各種多糖類との反応性を評価した。

(2) ヒト検体前処理法の最適化

ヒト血清に添加した微量な 16BG を本測定法で測定するにあたり、検出を阻害する因子の存在が示唆されていた。そこで、本項目では市販のヒトプール血清に可溶性 16BG (Pustulan) を添加し、本測定法で測定可能な前処理法の条件を検証した。

(3) β -グルカン経口摂取マウス検体との反応性評価

16BG は様々な食品、たとえばシイタケなどの食用茸にも豊富に含まれることが知られている (Yamanaka D, *et. al.*, *Int J Med Mushrooms*, **22**:855-868 (2020))。しかし、経口摂取した 16BG の生体内での挙動はほとんど知られておらず、本測定法による血清中 16BG 測定に日々の食事が影響する可能性を考察することは難しい。そこで本項目では、食用茸、穀物または精製 β -グルカンを含むマウス飼料を調整し、連日マウスへ投与した際の血中から 16BG が検出されるか検討した。さらに、低濃度デキストラン硫酸 Na (DSS) をマウスに自由飲水させることで腸粘膜バリアを低下させた状況下で、16BG を経口投与し、血中から 16BG が検出されるか検討した。

(4) 16BG 静脈投与マウス検体との反応性評価

16BG (Pustulan) を静脈内投与したマウスを解析し、体内から 16BG が消失するまでの時間を検証した。16BG の静脈内投与後、改変型酵素 (16BG 結合タンパク質) を用いて臓器内の 16BG を染色可能か検討した。さらに、16BG の静脈内投与後、エンド β -1,6-グルカナーゼを追加投与し、臓器内から 16BG が消失するか解析した。各種炎症による 16BG の挙動の変化を明らかにするため、16BG の静脈内投与後、LPS / D-ガラクトサミンを投与したマウスの臓器内の 16BG 量を解析

した。

4. 研究成果

(1) 各種 β -グルカンとの反応性評価

化学発光基質を用いた 16BG 特異的 Sandwich-ELISA と様々な多糖検体との反応性を評価し、真菌感染症以外の血清検体において偽陽性反応が生じる可能性を検証した。その結果、本測定法は、わが国で古くから医療用途に用いられてきた β -グルカン製剤のうち、スエヒロタケ由来のシゾフィラン (SPG: モノグリコシル β -1,6-分岐 13BG) とは反応性を示さなかったのに対し、カワラタケ由来のクレスチン (PSK: β -グルカン/タンパク質複合体) とは僅かに反応した。このことから、免疫賦活作用あるいは抗腫瘍効果などを期待して注射剤として利用される一部の β -グルカン製剤を用いた場合には、その血液中からも 16BG が検出されると考えられ、ある条件下において本測定法に偽陽性反応が生じる可能性が示された。その他の β -グルカンとして、市販の植物由来 β -グルカン (大麦 β -グルカン; β -1,4-分岐 13BG)、細菌由来 β -グルカン (カードラン; 直鎖 13BG) には反応しないことが示されたが、食品に利用される酵母由来 β -グルカン (β -1,6-分岐 13BG) とは反応性を示した。また、臨床で利用される 13BG 試験 (リムルス試験) は、免疫グロブリン製剤 (IVIg) と反応性を示すが、pH 調整後の IVIg は改変型酵素 (16BG 結合タンパク質) とは反応しないことが確認された。

これらの結果より、従来 13BG 試験 (リムルス試験) に比べて、16BG 特異的 Sandwich-ELISA が真菌由来 β -グルカンに対する反応特異性が高いものの、13BG 試験同様に一部の注射剤使用時には偽陽性反応が発生する可能性があることが明らかとなった。また、食品由来の β -グルカンとの反応性も見られたが、実際にヒトが 16BG を含む食品を経口摂取した場合に、血中に 16BG が移行するかは不明な点が多く、さらなる検討の必要性が示された。

(2) ヒト検体前処理法の最適化

16BG (Pustulan) を様々な希釈濃度の市販の健康人プール血清と混合し、16BG 特異的 Sandwich-ELISA (比色法) により測定したところ、血清の濃度依存的に反応性が低下することが示された (図 2A)。16BG は熱に安定な多糖であるため、血清を PBS で 2 倍希釈して様々な温度で処理し、さらに PBS を加えて遠心分離後、上清中の 16BG を測定したところ、加熱温度に依存した反応性の回復が認められた。興味深いことに、70 度で 5 分間加熱した場合、未処理検体と同等の反応性 (回収率 10% 未満) を示したが、90 度で 5 分間加熱することで、PBS 中の 16BG と同程度の反応 (回収率 90% 程度) まで回復することが明らかとなった (図 2B)。本測定法を阻害する血清中の因子は、90 度以上の加熱で失活すると考えられ、安価な希釈加熱法は検体前処理法として有効であると結論付けた。

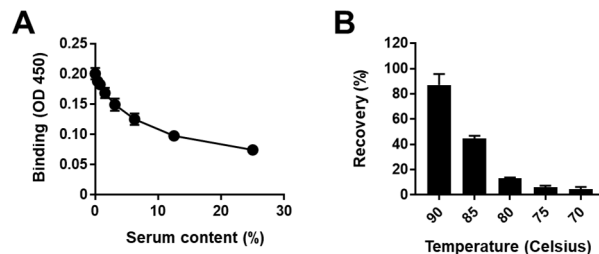


図 2. β -1,6-グルカン特異的 ELISA に対するヒト血清の影響

(3) β -グルカン経口摂取マウス検体との反応性評価

β -グルカン不含有合成飼料 (コントロール飼料) に 16BG を豊富に含む食用茸子実体末 (最大 10%) または可溶性精製 16BG 画分乾燥粉末 (1%) を混合し、マウス用固形飼料を調整した。これらの飼料を 1 週間から 1 ヶ月程度連日摂取させ、16BG 特異的 Sandwich-ELISA により血中の 16BG 量を測定した結果、コントロール飼料摂取群と比較して血清中 16BG 量が増加することはなかった。一方、主要な臓器を摘出し、ビーズ破砕機で処理後、可溶性画分に含まれる 16BG 量を測定したところ、16BG 含有飼料経口摂取マウスにおいて肝臓抽出液から微量な 16BG が検出された。通常、消化管から吸収されにくいと考えられている β -グルカンの肝臓への移行が 16BG に特有のものであるのか、 β -1,4-分岐 13BG 含有飼料を用いて検証を試みたが、少なくとも現在流通している 13BG 検出法を用いた場合にマウス体内から検出されることはなかった。ただし、市販の 13BG 検出試薬の β -1,4-分岐 13BG への反応性は十分とは言えず、16BG 以外の β -グルカンの体内動態については、現時点で詳細に解析するための技術が不足しているため、今後さらなる検討の必要性が残された。

(4) 16BG 静脈投与マウス検体との反応性評価

16BG (Pustulan) を静脈内投与したマウスの血清中 16BG は、投与から 24 時間後には消失した。投与 24 時間後に各種臓器を摘出し、ビーズ破砕機で処理後、可溶性画分に含まれる 16BG 量を測定したところ、腎臓、脾臓、肝臓、肺などから 16BG が検出された。ELISA に対する反応が 16BG 特異的であるか検証するため、16BG の静脈内投与翌日にエンド β -1,6-グルカナーゼ (Neg1) を静脈内投与したところ、肝臓内に存在していた 16BG に対する反応の大部分は消失した (図 3A)。また、16BG を静脈内投与したマウスの肝臓を摘出し、切片を作成後改変型酵素 (16BG 結合タンパク質) で処理し、蛍光色素 (PE) 標識後に顕微鏡下で観察した結果、16BG 投与群では臓器内に

スポット状の 16BG の分布が確認された。これらの結果から、16BG 特異的 Sandwich-ELISA が、血液・組織内の 16BG を正確に検出していることが示された。次に、組織内の 16BG が消失するまでの期間を解析するため、マウスに 16BG (Pustulan) を静脈内投与し、経時的に肝臓内の 16BG 量を測定したところ、投与から 4 週間後までは検出可能な量が存在していることが明らかとなった (図 3B)。

続いて、組織中の 16BG が炎症により血中へ移行する可能性について検証するため、マウスに 16BG (Pustulan) を静脈内投与した翌日に LPS / D-ガラクトサミンを追加投与し、血中・肝臓中の 16BG を測定した。その結果、コントロール群と LPS / D-ガラクトサミン投与群のいずれも血清中 16BG は検出されず、肝臓に残されている 16BG 量にも有意な差は見られなかった。このことは一度組織内に取り込まれた 16BG は血液中に移行しにくいことを示しており、健康な状態のマウスにおいて、食事由来の β -1,6-グルカンが血中から検出される可能性は低いことを示している。ヒトとマウスの β -1,6-グルカン体内動態が完全に一致するかの判断は難しいが、基本的にはマウスと同等の挙動を示すと思われることから、16BG 特異的検出法に偽陽性反応が生じる可能性は低いと考えられる。

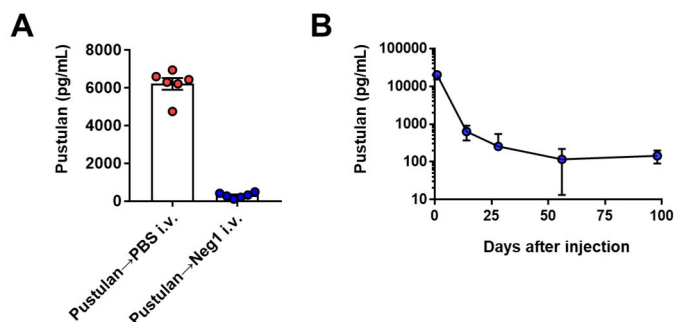


図 3. 静脈内投与した β -1,6-グルカンの体内からの消失

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoshiyuki Adachi, Hidetaka Nakata, Tetsuya Tanabe, Daisuke Yamanaka, Takashi Kanno, Ken-ichi Ishibashi and Ohno Naohito	4. 巻 22
2. 論文標題 Development of a Highly Sensitive α -Glucan Detection System Using Scanning Single-Molecule Counting Method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5977 ~ 5977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22115977	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Karen Kubo, Kaori Itto-Nakama, Shinsuke Ohnuki, Yoko Yashiroda, Sheena C Li, Hiromi Kimura, Yumi Kawamura, Yasuhiro Shimamoto, Ken-Ichi Tominaga, Daisuke Yamanaka, Yoshiyuki Adachi, Shinichiro Takashima, Yoichi Noda, Charles Boone and Yoshikazu Ohya	4. 巻 10
2. 論文標題 Jerveratrum-Type Steroidal Alkaloids Inhibit α -1,6-Glucan Biosynthesis in Fungal Cell Walls	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e00873-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.00873-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Daisuke Yamanaka, Suzuki Kento, Kimura Masahiro, Fumitaka Oyama and Yoshiyuki Adachi	4. 巻 282
2. 論文標題 Functionally modified chitotriosidase catalytic domain for chitin detection based on split-luciferase complementation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Carbohydrate Polymers	6. 最初と最後の頁 119125 ~ 119125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carbpol.2022.119125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Daisuke Yamanaka, Suzuka Kurita, Yuka Hanayama and Yoshiyuki Adachi	4. 巻 22
2. 論文標題 Split Enzyme-Based Biosensors for Structural Characterization of Soluble and Insoluble α -Glucans	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22041576	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Duncan Forster, Sheena Li, Yoko Yashiroda, Mami Yoshimura, Zhijian Li, Luis Isuhuaylas, Kaori Itto-Nakama, Daisuke Yamanaka, Yoshikazu Ohya, Hiroyuki Osada, Bo Wang, Gary Bader and Charles Boone	4. 巻 19
2. 論文標題 BIONIC: biological network integration using convolutions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Methods	6. 最初と最後の頁 1250 ~ 1261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41592-022-01616-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 山中 大輔, 栗田 涼香, 大野 尚仁, 安達 禎之
2. 発表標題 機能改変エンドグルカナーゼを用いた細胞壁 -1,6-グルカンの高感度検出法
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第54回研究報告会
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 安達 禎之, 山中 大輔, 菅野 峻史, 石橋 健一, 大野 尚仁
2. 発表標題 一分子蛍光検出法による高感度な真菌多糖検出システムに関する検討
3. 学会等名 第65回 日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 山中 大輔, 菅野 峻史, 安達 禎之
2. 発表標題 スプリットルシフェラーゼ融合 -グルカン認識タンパク質を用いた真菌細胞壁の糖鎖構造解析
3. 学会等名 第65回 日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 山中 大輔, 栗田 涼香, 菅野 峻史, 安達 禎之
2. 発表標題 Split-NanoLuc融合バイオセンサーによる α -1,3/1,6-グルカンの構造特異的検出法の開発
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 小林 茉鈴, 山中 大輔, 杉浦 真裕, 菅野 峻史, 元井 章智, 安達 禎之
2. 発表標題 高感度 α -1,6-グルカン測定法を用いた α -1,6-グルカンの組織分布に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 山中 大輔
2. 発表標題 多糖の高感度検出技術開発と真菌研究への応用
3. 学会等名 第95回 日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Daisuke Yamanaka, Suzuka Kurita, Takashi Kanno and Yoshiyuki Adachi
2. 発表標題 Deletion of α -1,6-glucan on the Zymosan surface attenuates the dectin-1-dependent NF- κ B activation
3. 学会等名 16th Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 山中 大輔, 石橋 健一, 大野 尚仁, 安達 禎之
2. 発表標題 機能改変 -グルカナーゼを用いた -1,6-グルカン検出法における各種真菌の反応性評価
3. 学会等名 第64回 日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 安達 禎之, 山中 大輔, 菅野 峻史, 石橋 健一, 大野 尚仁
2. 発表標題 一分子蛍光検出法を用いた高感度な真菌多糖検出システムの検討
3. 学会等名 第64回 日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 山中 大輔, 中島 大智, 木村 将大, 小山 文隆, 大野 尚仁, 安達 禎之
2. 発表標題 機能改変 -1,6-グルカナーゼを用いた -1,6-グルカンの高速定量法の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 山中 大輔, 後藤 佳世, 中島 大智, 木村 将大, 小山 文隆, 大野 尚仁, 安達 禎之
2. 発表標題 -1,6-グルカナーゼの機能改変による高感度 -1,6-グルカン測定法と応用
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 杉浦 真裕, 山中 大輔, 高浜 亜季子, 元井 章智, 大野 尚仁, 安達 禎之
2. 発表標題 高感度 α -1,6-グルカン測定法を用いた食餌由来 α -1,6-グルカンの吸収と分布に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 山中 大輔, 鈴木 健斗, 木村 将大, 小山 文隆, 安達 禎之
2. 発表標題 ヒトキチナーゼを用いた真菌細胞壁キチンの高感度検出法の開発
3. 学会等名 第41回 関東医真菌懇話会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 山中 大輔, 安達 禎之
2. 発表標題 SLCAを用いた α -グルカン合成阻害薬曝露後のカンジダ細胞壁多糖構造解析
3. 学会等名 第66回 日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 山中 大輔
2. 発表標題 糖質分解酵素の機能改変と真菌多糖解析への応用
3. 学会等名 第66回 日本医真菌学会総会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 鈴木 健斗, 山中 大輔, 安達 禎之
2. 発表標題 機能改変型ヒトキトリオンダーゼを用いたELISA様試験による生体内キチンの検出
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 島崎 錬, 山中 大輔, 安達 禎之
2. 発表標題 機能改変型キチナーゼを用いたキチン検出法による血清中真菌キチンの構造変化の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 山中 大輔, 安達 禎之
2. 発表標題 真菌細胞壁多糖の高感度検出を目的とした糖質加水分解酵素の機能改変
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 -1,3-1,6-グルカンの測定方法	発明者 中田秀孝, 安達禎之, 石橋健一, 山中大輔, 大野尚仁	権利者 オリンパス株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、PCT /JP2020/043393	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 -1,6-分岐 -1,3-グルカンまたは -1,3-グルカンの検出・定量方法および検出・定量キット	発明者 山中大輔, 安達禎之	権利者 東栄新薬株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-149797	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------